

15 AUG 2003

REC'D 25 NOV 2003

WIPO PCT

PCT/KR 03/02332
RO/KR C3.11.2003

PCT/KR03/2332 10/533077



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Intellectual
Property Office.

출원 번호 : 10-2003-0075511

Application Number

출원 년 월 일 : 2003년 10월 28일

Date of Application OCT 28, 2003

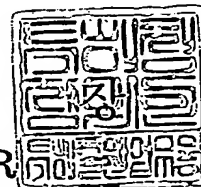
출원인 : 이경림
Applicant(s) LEE KYUNG LIM



2003 년 11 월 03 일

특 허 청

COMMISSIONER



**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

BEST AVAILABLE COPY

【서지사항】

【서류명】 특허출원서
【권리구분】 특허
【수신처】 특허청장
【제출일자】 2003.10.28
【발명의 명칭】 이유노글로블린 이 의존적 히스타민 방출 인자의 분비 억제용 조성물
【발명의 영문명칭】 Composition for preventing secretion of immunoglobulin E-dependent histamine releasing factor
【출원인】
【성명】 이경림
【출원인코드】 4-2000-026470-8
【대리인】
【명칭】 특허법인다래
【대리인코드】 9-2003-100021-7
【지정된변리사】 박승문, 조용식, 윤정열, 김정국, 안소영, 김희근, 권경희
【포괄위임등록번호】 2003-043075-0
【발명자】
【성명】 이경림
【출원인코드】 4-2000-026470-8
【발명자】
【성명의 국문표기】 이철희
【성명의 영문표기】 LEE, Chul Hee
【주민등록번호】 540211-1148416
【우편번호】 110-744
【주소】 서울특별시 종로구 연건동 서울대학교 병원 이비인후과
【국적】 KR
【발명자】
【성명의 국문표기】 최승희
【성명의 영문표기】 CHOI, Seung Hee
【주민등록번호】 780915-2149115
【우편번호】 120-750
【주소】 서울특별시 서대문구 대현동 이화여자대학교 약학대학
【국적】 KR

【우선권주장】

【출원국명】

KR

【출원종류】

특허

【출원번호】

10-2002-0067653

【출원일자】

2002.11.02

【증명서류】

첨부

【심사청구】

청구

【취지】

특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사를 청구합니다. 대리인
특허법인다래 (인)

【수수료】

【기본출원료】

20 면 29,000 원

【가산출원료】

7 면 7,000 원

【우선권주장료】

1 건 26,000 원

【심사청구료】

13 항 525,000 원

【합계】

587,000 원

【감면사유】

개인 (70%감면)

【감면후 수수료】

194,300 원

【첨부서류】

1. 요약서·명세서(도면)_1통

【요약서】

【요약】

본 발명은 IgE-의존적 히스타민 방출 인자의 분비 억제용 조성물 및 그 약학적 용도에 관한 것이다.

본 발명의 조성물은 양성자 펌프 저해 활성을 지니는 벤즈이미다졸계 화합물을 유효성분으로 함유한다.

또한 본 발명의 조성물은 양성자 펌프 저해 활성을 지니는 페녹티민, 올레인산, 카테킨, 스코파롤시올, 헤타갈로일 글루코즈, 부파린, 그리고 매크로라이드계 항생제인 바팔로마이신 및 콘카나마이신 중 선택된 하나 이상의 물질을 추가로 또는 단독으로 함유할 수 있다.

본 발명의 조성물은 IgE-의존적 히스타민 방출 인자에 의해 유발되는 각종 알러지 질환 및 말라리아의 예방 및 치료용 약제학적 조성물로서 유용하게 사용될 수 있다.

【대표도】

도 3

【명세서】

【발명의 명칭】

이뮤노글로블린 이 의존적 히스타민 방출 인자의 분비 억제용 조성물 {Composition for preventing secretion of immunoglobulin E-dependent histamine releasing factor}

【도면의 간단한 설명】

도 1은 HRF가 다양한 알러지성 환자들의 혈액 중에 분비됨을 나타낸 도이다.

도 2는 HRF가 알러지 유발물질에 의해 세포 외부로 분비됨을 나타낸 도이다.

도 3은 본 발명의 조성물이 시험관 내에서(in vitro) 알러지 유발물질에 의해 증가되는 HRF 분비를 억제함을 나타낸 도이다.

도 4는 본 발명의 조성물이 생체 내에서(in vivo) 알러지 유발물질에 의해 증가되는 혈 중 HRF 농도를 감소시킴을 나타낸 도이다.

도 5는 본 발명의 조성물이 알러지성 비염 증상의 발현을 억제함을 나타낸 도이다.

도 6은 본 발명의 조성물이 알러지성 비염 마우스에서 호산구 수치의 증가를 감소시킴을 나타낸 도이다.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

<7> 본 발명은 IgE-의존적 히스타민 방출 인자(immunoglobulin E-dependent histamine releasing factor: 이하 'HRF'라 한다)의 분비 억제용 조성물 및 그 약학적 용도에 관한 것이다.

- <8> HRF는 알러지 반응 중 IgE-의존적 후기 반응(late phase reaction, 이하 'LPR' 이라 한다)에서 중요한 역할을 수행하며, 호염기구(basophil)를 자극하여 히스타민 분비를 유도함으로써, 다양한 알러지 질환을 매개하는 것으로 알려져 있다(McDonald et al., 1995).
- <9> 또한 HRF는 말라리아 모기에서 항말라리아제인 아르테미시닌(Artemisinin)과 결합하는 일종의 중양 단백질인 것으로도 알려져 있다(Bhisutthibhan, 1998).
- <10> HRF가 유발하는 히스타민성 알러지 질환으로는 아나필락시스(anaphylaxis), 천식, 담마진, 알러지성 비염, 알러지성 기관지확장증, 건초열(hay fever), 아토피성 피부염 등이 있으며, 특히 환경 오염으로 인해 다양한 알러젠에 노출될 확률이 급증하면서 알러지 질환은 더욱 증가하는 추세이다.
- <11> HRF는 친수성이며, 세포 밖으로 방출되는 단백질이 일반적으로 지니는 신호 펩타이드(signal peptide)를 갖고 있지 않은 세포질 단백질이다. 그러나 세포 외부에서도 HRF가 검출된다는 연구 결과가 보고된 바 있으며(McDonald et al., 1995), HRF는 세포 외부에서 IgE-감작된(sensitized) 호염기구를 자극하여 히스타민을 분비하게 한다는 사실이 밝혀졌다.
- <12> 따라서, 세포질 단백질인 HRF가 세포 외부로 분비되는 기작을 밝히고, 그 과정을 차단할 수 있는 물질을 개발함으로써, HRF가 유발하는 다양한 질환을 예방하고 억제하려는 노력이 진행되어 왔다.
- <13> 현재까지 HRF처럼 신호 펩타이드를 가지고 있지 않으면서 세포 외부에서도 검출되는 분자로, 염기성 섬유모세포 성장 인자(basic fibroblast growth factor(FGF-2)), plasminogen activator inhibitor 2(PAI 2), 탄수화물 결합 단백질(carbohydrate-binding protein 30(CBP 30)) 등이 알려져 있다.

<14> 이들의 분비 경로에 대해서는 아직도 정확히 밝혀지지 않았으나, 최근 나트륨/칼륨 펌프(Na,K-ATPase pump)가 유력한 FGF-2 방출 경로일 수 있다는 연구결과가 발표된 바 있다 (Florkiewicz RZ, 1998).

<15> 이러한 사실에 착안한 본 발명자들은 HRF 또한 펌프를 경유하여 분비될 수도 있을 것이라 가정하여, HRF의 분비 경로를 밝히고, HRF 분비를 억제할 수 있는 조성물을 발명하였다.

【발명의 이류고자 하는 기술적 과제】

<16> 본 발명에서는 HRF 분비 억제용 조성물 및 그 약학적 용도를 제공하고자 한다.

【발명의 구성 및 작용】

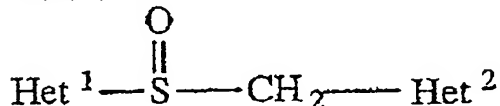
<17> 본 발명은 IgE-의존적 히스타민 방출 인자의 분비 억제용 조성물 및 그 약학적 용도를 제공한다.

<18> 본 발명의 조성물은 양성자 펌프(proton pump) 저해 활성을 지니는 벤즈이미다졸계 화합물(benzimidazolic compound)을 유효성분으로 함유한다.

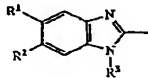
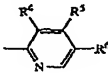
<19> 본 발명에서 '양성자 펌프'는 농도 구배에 역행하여 수소이온(H^+)을 세포막 밖으로 능동 수송하는 막단백질인 H^+-K^+ ATPase를 의미한다.

<20> 본 발명에서 벤즈이미다졸계 화합물은 치환된 벤즈이미다졸 링, 피리딘(pyridine) 고리 및 그 사이에 위치하는 메칠설퍼닐기(methylsulfinyl group)로 이루어진 지질 용해성 약염기로, 하기 화학식 1의 구조를 지닌다.

<21> 【화학식 1】



<22>

식 1에서 Het¹은  이고, Het²는 이며, R¹ 및 R²는 동일하거나 상이하고, 수소, 메톡시 및 디플루오로메톡시로부터 선택되고, R³은 수소와 나트륨으로부터 선택되고, R⁴, R⁵ 및 R⁶는 동일하거나 상이하고, 수소, 메틸, 메톡시, 메톡시프로폭시 및 트리플루오로메톡시로부터 선택된다.

<23> 본 발명에서 벤즈이미다졸계 화합물은 구체적으로 오메프라졸(omeprazole), 란소프라졸(lansoprazole), 판토프라졸(pantoprazole), 라베프라졸(rabeprazole) 중에서 선택된 하나 이상일 수 있다.

<24> 본 발명에서 벤즈이미다졸계 화합물은 상기 물질 외에 이들의 유도체 및 이성질체가 될 수 있으며, 구체적으로 히드록시-오메프라졸, 히드록시-란소프라졸, 오메프라졸의 카르복실산 유도체, 데스메틸-판토프라졸, 에소메프라졸(esomeprazole) 등이 될 수 있다.

<25> 본 발명의 벤즈이미다졸계 화합물은 양성자 펌프를 저해함으로써, 세포 외부로 HRF가 분비되는 것을 억제한다. 이는 양성자 펌프가 HRF의 분비 과정에 관여하기 때문이다.

<26> 따라서 본 발명의 조성물을 사용하면 히스타민 농도를 증가시키는 알러지 유발물질에 의한 HRF 분비를 억제할 수 있다.

<27> 특히 본 발명의 조성물은 C48/80에 의한 HRF 분비를 억제하여 혈중 HRF 및 히스타민의 농도를 감소시킴으로써, C48/80에 의한 전신성 아나필락시 반응에 의한 사망 확률을 현저히 감소시킨다.

- <28> 본 발명의 조성물은 혈중에 존재하는 HRF와 히스타민의 양을 감소시킴으로써, 알러지 유발물질에 의해 일어나는 전신성 아나필락시 반응에 의한 사망 확률을 현저히 감소시키고, 알러지성 비염의 증상을 효과적으로 완화시킨다.
- <29> 또한 본 발명의 조성물은 알러지성 비염 마우스 모델에서 알러지성 비염의 증상 발현과 조직학적 변화를 감소시키는 효과가 있다.
- <30> 따라서 본 발명의 조성물은 HRF에 의해 유발되는 각종 알러지 질환, 즉 아스피린과 같은 약물 또는 음식에 의한 천식이나 알러지성 기관지 천식 등을 포함하는 천식, 담마진, 아나필락시, 알러지성 비염, 알러지성 기관지 확장증, 건초열, 아토피성 피부염과, 말라리아의 예방 및 치료를 위한 약제학적 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.
- <31> 본 발명의 조성물은 상기 물질들과 동일 또는 유사한 기능을 지닌 물질을 추가의 유효성분으로, 또는 단독의 유효성분으로 함유할 수 있으며, 구체적으로는 양성자 펌프 저해 활성을 지니는 것으로 알려진 페녹티민(fenoxitine), 올레인산(oleic acid), 카테킨(catechin), 스코파둘시올(scopadulciol), 펜타갈로일 글루코스(pentagalloyl glucose), 부파린(bufalin), 그리고 매크로라이드(macrolide)계 항생제인 바필로마이신(bafilomycin) 및 콘카나마이신(concanamycin) 중 선택된 하나 이상의 물질을 추가로 또는 단독으로 함유할 수 있다.
- <32> 본 발명의 조성물은 필요에 따라 상기 물질들과 상이한 기능을 지닌 물질을 유효성분으로서 추가로 함유할 수 있다.
- <33> 본 발명의 조성물은 상기 유효성분 이외에, 약제학적으로 적합하며 생리학적으로 허용되는 보조제를 사용하여 제조될 수 있으며, 상기 보조제로는 용매, 붕해제, 감미제, 결합제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제 또는 향미제 등의 가용화제를 사용할 수 있다.

<34> 본 발명의 조성물은 투여를 위해 상기 기재한 유효성분 이외에, 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 추가로 포함하여 제제화할 수 있다.

<35> 약제학적으로 허용 가능한 담체는 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 하나 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 더 나아가 당 분야의 적절한 방법으로, 또는 Remington's Pharmaceutical Science(최근판), Mack Publishing Company, Easton PA에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라, 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다.

<36> 본 발명의 조성물의 제제 형태는 과립제, 산제, 피복정, 정제, 캡슐제, 좌제, 시럽, 즙, 현탁제, 유제, 점적제 또는 주사 가능한 액제 및 활성 화합물의 서방출형 제제 등이 될 수 있다.

<37> 본 발명의 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구, 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 복강내, 흉골내, 경피, 비측내, 국소, 직장, 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 투여할 수 있다.

<38> 본 발명의 조성물의 투여량은 판토프라줄을 유효성분으로 함유하는 경우, 래트나 마우스 일 때에는 체중 1kg 당 10mg을, 사람일 때에는 체중 1kg 당 100 μ g~1mg을 사용하는 것이 바람직하다. 본 발명의 약제학적 조성물의 투여량은 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 유효성분 및 다른 성분의 종류 및 함량, 제형의 종류 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상

태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다.

<39> 본 발명의 조성물은 이전부터 이미 위궤양, 십이지장 궤양, Zollinger-엘리슨 증후군이나 역류성 식도염 치료에 사용되고 있는 약물로 그 안전성이 입증된 바 있으며, 생체에 별다른 부작용을 미치지 않는다.

<40> 본 발명의 조성물은 단독으로, 또는 식이요법, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병행하여 사용할 수 있다.

<41> 이하, 본 발명을 실시예에 의해 보다 상세히 설명하지만, 이것은 본 발명의 이해를 돕기 위한 것일 뿐, 하기 실시예에 본 발명의 범위가 국한되는 것은 아니다.

<42> [실시예 1] 본 발명의 조성물에 의한 HRF 분비 억제 효과

<43> 본 발명의 조성물에 의한 HRF 분비 억제 효과를 확인하기 위해, 우선 HRF 분비와 알러지 증상, 그리고 알러지 유발물질과의 상호 관계를 밝힌 후, 본 발명의 조성물이 HRF의 분비에 미치는 효과를 확인하였다.

<44> 1) HRF 분비와 알러지 증상, 그리고 알러지 유발물질과의 상호 관계 확인

<45> HRF 분비와 알러지 증상, 그리고 알러지 유발물질과의 상호 관계를 다음과 같이 확인하였다.

<46> 1-1) 다양한 알러지 증상에서 HRF의 분비 증가 확인

<47> 다양한 알러지 증상에서 HRF의 분비가 증가함을 확인하기 위해, 아스피린 투여에 의해 천식 반응을 나타내는 환자, 아스피린 이외의 다른 알러젠에 의해 천식 반응을 나타내는 환자, 알러지성 기관지 천식 환자, 음식 섭취 후 운동에 의한 아나필락시스 반응(food-dependent exercise-induced anaphylaxis)을 나타내는 환자, 담마진 환자 등 다양한 형태의 알러지 환자를 선택하여, HRF의 분비 증가를 확인하였다.

<48> 아스피린 투여에 의해 천식 반응을 나타내는 환자의 경우, 아스피린 투여 직후와 어느 정도 시간이 지난 후에 모두 천식 반응을 나타내는 양성 반응(dual response) 환자와, 아스피린 투여 직후에만 천식 반응을 나타내는 조기 반응(early response) 환자의 두 군으로 분류하였다.

<49> 혈중 HRF의 존재를 확인하기 위해 각 환자로부터 소량의 혈청을 얻었으며, 아스피린이 아닌 다른 알러젠에 대해 알러지 반응을 나타내는 환자의 경우, 알러젠에 노출되지 않은 상태일 때 혈청을 채취하였다. 대조군으로 알러지 반응을 나타내지 않는 정상인의 혈청도 함께 채취하였다.

<50> 각 군의 혈청을 동량의 4 × 시료 완충액과 혼합하였으며, 이때 사용한 시료 완충액은 글리세롤의 비율을 반으로 하여 전기영동시 밴드가 끌리는 현상을 방지하도록 하였다. 상기 시료 혼합액을 3분간 끓는 물에 넣어 변성시키고 잠시 얼음에서 식힌 후, 5분간 12000rpm에서 원심 분리하여 상등액만을 취하였다.

<51> 상기와 같이 준비된 시료에 대해, 실시예 1의 2-1)과 마찬가지로 방법에 의해 웨스턴 분석을 수행하고, 그 결과를 도 1에 나타내었다.

<52> 도 1에 나타난 바와 같이, 아스피린 투여에 대한 양성 반응 환자(a)와, 조기 반응 환자(b), 아스피린 이외의 다른 알러젠에 의한 천식 환자(c), 알러지성 기관지 천식 환자(d), 음식 섭취 후 운동에 의한 아나필락시스 반응을 나타내는 환자(e), 담마진 환자(f)의 혈청에서는 모두 높은 농도의 HRF가 검출되었다. 반면 정상인의 혈청에서는 HRF가 거의 검출되지 않았다(g).

<53> 이처럼 HRF는 다양한 알러지 환자에게서 검출되므로, HRF 분비는 알러지 반응에서 중요한 역할을 수행함을 알 수 있다.

<54> 1-2) C48/80에 의한 HRF의 분비 증가

<55> 알러지 유발물질이 HRF의 분비에 미치는 영향을 확인하기 위해, 대표적인 알러지 유발물질인 C48/80(compound 48/80, Sigma)을 선택하여 다음과 같이 실험을 수행하였다.

<56> HRF 분비 세포 모델로 U-937 세포를 선택하여, 1% L-글루타민, 100U/ml 페니실린 및 100U/ml 스트렙토마이신, 10% 우태아혈청을 첨가한 RPMI 1640 배지에서 37℃, 5% CO₂의 조건으로 배양하였다.

<57> U-937 세포의 배양액을 1000rpm에서 3분간 원심분리하여 세포를 수집하고, 인산완충액(phosphate buffered saline(PBS): 200mg/l 염화칼륨, 200mg/l 인산수소칼륨, 8g/l 염화나트륨, 1.15g/l 인산수소나트륨)로 1번 세척한 후, 다시 1000rpm에서 3분간 원심분리하여 세포를 수집하였다.

<58> 수집된 세포에 1% L-글루타민만을 첨가한 RPMI 배지를 가하고 흔들어 주면서 가라앉은 세포가 배지와 잘 섞이도록 한 후, 일부액을 취하여 트리판 블루(trypsin blue, Gibco BRL)로 염색하여 살아있는 세포의 수를 측정하였다. 6 웰 플레이트(well plate)에 웰당 10⁶개의 세포

를 갈아주고, 5시간 동안 37℃, 5% CO₂의 조건에서 세포를 기아 상태 하에 방치하였다(cell starvation). 세포 기아가 끝난 후, 각 웰에 대해 C48/80(Sigma)을 0 μg/ml, 2 μg/ml, 4 μg/ml, 6 μg/ml, 8 μg/ml, 10 μg/ml 농도로 30분간 처리하고 세포와 상등액(supernatant)을 따로 분리하여 취하였다.

<59> 상등액에 100mM PMSF, 1mg/ml 아프로티닌(aprotinin), 1M 벤즈아미딘(benzamidine), 10 mg/ml 류펩틴(leupeptin)으로 구성된 단백질분해효소 저해제 혼합액(protease inhibitors cocktail)을 첨가하여, 원심력을 이용한 농축기(centricon, Sartorius)로 4℃, 12000rpm에서 수시간 원심분리하여 처음 부피의 1/100로 농축하였다.

<60> 농축액에 4 ×로 완충액(sample buffer: 1M 트리스(pH 6.8), 10% SDS, 100% 글리세롤(glycerol), 여러 방울의 브롬페놀 블루(bromphenol blue), 소량의 베타 머캅토에탄올(β-mercaptoethanol), 3차중류수)을 첨가하고, 끓는 물에 10분간 담가 변성시킨 후, 즉시 얼음으로 옮겨 변성된 단백질이 원래의 상태로 복귀하는 것을 방지하였다.

<61> 이러한 과정을 통하여 얻어진 시료를 15% SDS-PAGE 겔을 이용하여 전기영동한 후, 니트로셀룰로스 막(nitrocellulose membrane)에 전이시켜 웨스턴 블롯팅(Western blotting) 방법으로 분석하였다.

<62> 웨스턴 분석시 일차항체는 항토끼 폴리클로날 HRF 항체(anti-rabbit polyclonal HRF antibody)를 1:4000으로 트리스 완충액에 희석하여 사용하고, 이차항체는 항토끼-HRP 항체(anti-rabbit horseradish peroxidase antibody)를 1:10000으로 트리스 완충액에 희석하여 사용하였다. 이후, 세척된 막에 대해 이미지 분석 기계를 이용하여 단백질 밴드를 확인하고, 그 결과를 도 2에 나타내었다.

<63> 도 2에 나타난 바와 같이, 알러지 유발물질 C48/80은 농도의존적으로 HRF의 분비를 증가시켰다. 이러한 특성으로 인해, C48/80은 이후의 실시예에서 HRF 분비 증가제로 사용되었다.

<64> 2) 본 발명의 조성물 제조

<65> 본 발명의 조성물은 오메프라졸(Sigma)을 에탄올에 13mM의 농도로 녹여 제조하였다.

<66> 본 발명의 조성물을 세포에 처리할 때는 오메프라졸의 최종농도가 10 μ M, 100 μ M 이 되도록 하였다.

<67> 3) 본 발명의 조성물에 의한 HRF 분비 억제 효과

<68> 본 발명의 조성물에 의한 HRF 분비 억제 효과를 다음과 같이 확인하였다.

<69> 상기 실시예 1의 1-2)과 마찬가지로의 방법으로 6 웰 플레이트에 세포를 깔고 5시간 동안 기아상태에서 방치한 후, 아무 것도 처리하지 않은 군, C48/80을 10 μ g/ml 처리한 군, 오메프라졸을 각각 10 μ M, 100 μ M 처리한 군, 오메프라졸 10 μ M과 C48/80 10 μ g/ml를 같이 처리한 군, 오메프라졸 100 μ M과 C48/80 10 μ g/ml를 같이 처리한 군을 각각 준비하여, 세포와 상등액을 따로 분리하여 취하였다.

<70> 수집된 세포는 인산완충액으로 1번 세척하고 12000rpm에서 10분간 원심분리하여 다시 가라앉힌 후, 세포 용균 완충액(cell lysis buffer: 20mM 트리스(pH 7.4), 150mM 염화나트륨, 5mM EDTA, 0.5% 디옥시콜레이트(deoxycholate), 2mM EGTA, 1% NP40, 단백질 분해효소 혼합액)에 재현탁시켜 볼텍싱(vortexing)하였다.

- <71> 상기 세포혼합액을 30분간 얼음에 방치하면서 2~3회 정도 볼텍싱한 후, 12000rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 취하였다. 상등액의 일부를 취하여 브래드포드 방법(Bradford assay)으로 단백질을 정량한 후, 같은 양의 단백질을 포함하는 상등액에 4 × 시료 완충액을 가하고 10분간 끓여서 식혀 전기영동할 시료를 준비하였다. 상기 실시예 1의 1-2)와 마찬가지로 방법에 의해 웨스턴 분석을 수행한 후, 그 결과를 도 3에 나타내었다.
- <72> 도 3에 나타난 바와 같이, 본 발명의 조성물은 C48/80에 의해 증가되는 HRF 분비를 효과적으로 억제하였다. 이처럼 HRF의 분비가 양성자 펌프 저해제에 의해 억제되는 것으로 보아, HRF의 분비에 양성자 펌프가 관여한다는 것을 알 수 있다.
- <73> 따라서 양성자 펌프 저해제를 유효성분으로 함유하는 본 발명의 조성물은 HRF로 인한 다양한 알러지 증상의 예방 및 치료에 유용하게 사용할 수 있다.

<74> [실시예 2] 본 발명의 조성물에 의한 아나필락시스 억제 효과

<75> 1) 본 발명의 조성물 제조

<76> 본 발명의 조성물은 판토프라졸(판토록 주사, 태평양 제약)을 인산완충액에 4.8 mM의 농도로 녹여 제조하였다.

<77> 본 발명의 조성물을 동물에 투여할 때는 판토프라졸의 사용량이 10mg/kg이 되도록 하였

다.

<78> 2) 본 발명의 조성물에 의한 아나필락시스 억제 효과

<79> 본 발명의 조성물에 의한 아나필락시스 억제 효과를 다음과 같이 확인하였다.

<80> 체중이 200~220 g 되는 SD 쥐를 각 군 당 8마리씩 사용하여, 음성대조군과 양성대조군에는 인산완충액을 꼬리 정맥에 주사투여하고, 시험군에는 본 발명의 조성물을 판토프라졸의 사용량이 10 mg/kg가 되도록 꼬리정맥을 통해 주사투여하였다.

<81> 상기 전처치 후 30분이 지나서 음성대조군에는 인산완충액을 꼬리 정맥을 통해 주사하고, 양성대조군과 시험군에는 C48/80을 10 mg/kg로 꼬리 정맥에 주사를 하였다. 주사 후에는 C48/80에 의한 아나필락시 반응으로 사망하는 개체의 수를 관찰하였다. 사망과 생존의 기준은 C48/80 투여 후 1시간 동안 생존하는지의 여부로 결정하였으며, 각 군의 폐사율 결과를 표 1에 나타내었다.

<82> 【표 1】

구분	전처치(-30분)	아나필락시 유발	폐사율 (사망한 개체수/전체 개체수)
음성대조군	인산완충액	인산완충액	0/8
양성대조군		C48/80 10 mg/kg	7/8
실험군	본 발명의 조성물 (10 mg/kg)		4/8

<83> 표 1에 나타난 바와 같이, 본 발명의 조성물은 동물에서 아나필락시스 반응을 현저히 감소시킴을 알 수 있다. 이러한 결과는 본 발명의 조성물이 세포로부터 HRF의 분비를 억제한다는 실시예 1과 일치하는 것이다.

<84> 따라서, 본 발명의 조성물은 아나필락시스와 같이 HRF에 의해 유발될 수 있는 과민성 면역반응으로 인한 질환의 예방 및 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

<85> 3) 본 발명의 조성물에 의한 혈중 히스타민 농도의 감소

<86> 상기 실시예 2의 2)에서 나타난 본 발명의 조성물의 아나필락시스 억제 효과가, 혈중 히스타민 농도를 감소시키기 때문인지를 다음과 같이 확인하였다.

<87> 상기 실시예 2의 2)에서 실험에 사용된 쥐 중에서, 사망한 쥐의 경우 사망하기 직전 또는 직후에 쥐의 심장에서 혈액을 소량 취하고, 생존한 쥐의 경우 에테르로 마취를 하여 혈액을 소량 취하였다.

<88> 각각 얻은 혈액을 4℃에 밤새 방치하여 혈구를 응고시킨 후, 3000rpm에서 10분간 원심분리를 하여 혈청을 분리하였다. 혈청 중 일부를 취하여 3차 증류수에 10배~300배까지 희석한 후, 히스타민 분석용 기계로 혈중 히스타민 농도를 분석하여 그 결과를 표 2에 나타내었다.

<89> 【표 2】

구분	전처치	혈중 히스타민 평균치 (ng/ml)
음성대조군	생리식염수	측정 불가
양성대조군		2646.47
실험군	본 발명의 조성물 (10 mg/kg)	301.08

<90> (측정불가: 농도가 측정가능한 범위 미만임)

<91> 표 2에 나타난 바와 같이, 본 발명의 조성물을 전처치한 실험군의 혈액에서는 양성대조군에 비해 히스타민의 방출량이 80% 이상 감소하였다.

<92> 따라서, 본 발명의 조성물은 혈중 히스타민 양을 감소시키는 효과가 있으며, 그 결과 아나필락시스 반응의 예방 및 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

<93> 4) 본 발명의 조성물에 의한 혈중 HRF 농도의 감소

<94> 상기 실시예 2의 3)에서 나타난 본 발명의 조성물의 혈중 히스타민 농도 감소 효과가,

HRF의 분비 감소에 의한 것인지를 다음과 같이 확인하였다.

<95> 상기 실시예 2의 3)에서 얻은 각 군의 혈청을 동량의 4 ×이료 완충액과 혼합하였으며, 이때 사용한 시료 완충액은 글리세롤의 비율을 반으로 하여 전기영동 시 밴드가 끌리는 현상을 방지하도록 하였다. 상기 시료 혼합액을 3분간 끓는 물에 넣어 변성시키고 잠시 얼음에서 식힌 후, 5분간 12000rpm에서 원심분리하여 상등액만을 취하였다.

<96> 상기와 같이 준비된 시료에 대해, 실시예 1의 1-2)와 마찬가지로 웨스턴 분석을 수행하고, 그 결과를 도 4에 나타내었다.

<97> 도 4에 나타난 바와 같이, 본 발명의 조성물을 전처리하지 않고 아나필락시스 반응을 일으켜 사망한 군의 혈액에서는 대부분 HRF의 밴드가 뚜렷하게 검출되었다.

<98> 반면 본 발명의 조성물을 전처리하여 생존한 군의 혈액에서는 HRF 밴드가 거의 검출되지 않았다.

<99> 따라서 C48/80에 의한 아나필락시스 반응에 HRF가 중요하게 작용함을 알 수 있으며, 본 발명의 조성물은 HRF의 혈중 농도를 감소시키고, 순차적으로 히스타민의 양을 감소시킴으로써 아나필락시스 반응을 억제할 수 있음을 알 수 있다.

<100> [실시예 3] 본 발명의 조성물에 의한 알러지성 비염의 억제 효과

<101> 1) 본 발명의 조성물 제조

<102> 본 발명의 조성물을 동물에 처리할 때에는 인산완충액에 용해시켜 각 실험군 당 판토프라졸의 적용량이 각각 10mg/kg, 100 mg/kg이 되도록 하였다.

<103> 2) 실험방법

<104> 체중이 15~25g 되는 생후 3주령의 BALB-c 마우스 수컷들을 각 군 당 여섯 혹은 일곱 마리씩 분류하여 4개 군으로 나눈 후, 특정 항원이 없는(specific pathogen free, SPF) 환경에서 35일간 사육을 하였다.

<105> 알러지성 비염을 유발하기 위해, 난알부민(ovalbumin, chicken egg albumin, grade V, Sigam Chemical Co. Phillipsberg, NY) 10 μ g과 알루미늄 히드록시드(aluminum hydroxide, $Al(OH)_3$) 겔 1 mg을 인산완충액 0.3 ml에 30분 이상 혼합하여 난알부민 혼합액을 제조하였다.

<106> 상기 혼합물 0.1 ml을 마우스의 복강 내에 주사하고, 5일째와 14일째, 21일째에 각기 한 번씩 더 주사하였다. 마지막 복강 내 주사 1주일 후(28일째) 마이크로피펫을 이용해서 비공에 인산완충액 30 μ l 또는 난알부민 100 μ g을 인산완충액 30 μ l에 혼합한 혼합액을 주입하였다. 비공 투여 30분 전에는 인산완충액 또는 판토프라졸 10 mg/kg, 100 mg/kg를 각각의 해당 실험 군에 복강 내 주사하여 사용 약제의 알러지성 비염 억제 효과를 확인하였다.

<107> 비강 내 난알부민 투여와 투여 전 약물의 전처치는 1일 1회씩 7일간 시행하였으며, 7일간의 투여를 마친 다음 날 모든 군의 마우스에 탄산가스를 흡입시켜 안락사시켰다. 상기 실험 과정을 표 3에 정리하여 나타내었다.

<108>

【표 3】

일정		전신감작						안락사
분류	마리	1일	5일	14일	21일	비강유발 30분 전	28-24일	35일
음성대조군	6	OVA+	OVA+	OVA+	OVA+	인산완충액	인산완충액	
양성대조군	6	Alum	Alum	Alum	Alum		OVA	
실험군 1 (본 발명의 조성물 10 mg/kg 투여군)	7					본 발명의 조성물 10 mg/kg		
실험군 2 (본 발명의 조성물 100 mg/kg 투여군)	7					본 발명의 조성물 100 mg/kg		
100 mg/kg 투여군		OVA 10 μ g+Alum 1 mg을 인산완충액 300 μ l에 녹여 0.1 ml씩 복강 투여				OVA의 비강 투여 30 분 전에 전처치	인산완충액 또는 OVA 100 μ g/인산 완충액 30 μ l	

<109> (OVA: 난알부민, Alum: Al(OH)₃)

<110> 3) 본 발명의 조성물에 의한 알러지성 비염 증상의 억제 효과

<111> 본 발명의 조성물에 의한 알러지성 비염 증상의 억제 효과를 다음과 같이 확인하였다.

<112> 상기 2)와 같이 각 군에서 비강 내 유발을 시행한 후, 일정한 시간에 15분간 각각의 마우스에서 알러지성 비염의 특징적인 증상, 즉 재채기 횟수와 코를 긁는 동작과 같은 증상의 발현 횟수를 측정하여 이들의 합을 증상점수(symptom score)로 기록하였다. 2명의 관찰자가 측정한 점수의 평균을 증상점수로 기록하였으며, 관찰자 간의 차이가 30% 이상인 경우는 제외하였다. 각 군의 증상점수를 표 4와 도 5에 나타내었다.

<113>

【표 4】

구분		음성대조군	양성대조군	본 발명의 조성물 투여군 (10 mg/kg)	본 발명의 조성물 투여군 (100 mg/kg)
증상 점수	평균	31.83	65.00	27.29	48.00
	표준편차	20.84	33.15	28.49	17.42
p- value	음성대조군	-	0.078	0.391	0.1
	양성대조군	-	-	0.046	0.317

<114> 표 4 및 도 5에 나타난 바와 같이, 본 발명의 조성물을 투여한 군은 양성대조군에 비해

알러지성 비염에 의해 나타나는 증상이 현저하게 감소한 것으로 나타났다.

<115> 따라서 본 발명의 조성물은 알러지성 비염을 비롯하여 건초열 등의 알러지성 질환을 효과적으로 억제할 수 있음을 알 수 있다.

<116> 4) 조직학적 검사

<117> 본 발명의 조성물이 알러지성 질환의 조직학적 특징인 호산구 수치의 증가에 미치는 영향을 다음과 같이 확인하였다.

<118> 상기 2)에서 안락사시킨 마우스의 머리를 분리시킨 후, 10% 포르말린 액에서 24시간 동안 고정시켰다. 고정 후 마우스의 머리로부터 피부를 제거하고 탈석회액(decalcifier B, Accra Lab, Swedesboro, NJ)에 24시간 동안 담가 두었다. 비강조직을 파라핀에 포매한 후, 5 μ m 두께의 관상면(coronal section) 절편을 얻었다.

<119> 상기 절편에 대해 헤마톡실린(haematoxylin)과 에오신(eosin)으로 염색을 실시한 후 광학현미경 하에서 마우스 비강의 관상면에서 두 개의 이빨이 보이는 조직을 선정하여,

하비갑개(inferior turbinate)의 전반부에서 400배 배율로 점막 하의 호산구 갯수를 측정하였다. 각각의 측정치는 만-휘트니 유-테스트(Mann-Whitney U-test)를 이용하여 통계분석을 실시하였고, SPSS 윈도우 버전 10.0(SPSS for windows version 10.0, SPSS Inc., Chicago) 프로그램을 사용하여, 얻어진 결과 중 $p < 0.05$ 를 통계적으로 의미있는 것으로 해석하였다. 그 결과를 표 5 및 도 6에 나타내었다.

<120> 【표 5】

구분		음성대조군	양성대조군	본 발명의 조성물 투여군 (10 mg/kg)	본 발명의 조성물 투여군 (100 mg/kg)
증상 점수	평균	1.33	290.00	5.57	4.29
	표준편차	2.34	73.63	13.00	4.99
p- value	음성대조군	-	0.004	0.703	0.366
	양성대조군	-	-	0.003	0.003

<121> 표 5 및 도 6에 나타난 바와 같이, 본 발명의 조성물을 투여한 군은 양성 대조군에 비해 호산구 수치가 매우 낮은 것으로 나타났다.

<122> 따라서 본 발명의 조성물은 알러지성 비염을 비롯하여 건초열 등의 알러지성 질환을 효과적으로 억제할 수 있음을 알 수 있다.

【발명의 효과】

<123> 본 발명의 조성물은 알러지 유발물질에 의한 HRF 분비를 억제하는 효과가 있다.

<124> 본 발명의 조성물은 혈중에 존재하는 HRF와 히스타민의 양을 감소시킴으로써, 알러지 유발물질에 의해 일어나는 전신성 아나필락시 반응에 의한 사망 확률을 현저히 감소시키고, 알러지성 비염의 증상을 완화시키는 효과가 있다.

<125> 따라서 본 발명의 조성물은 HRF에 의해 유발되는 각종 알러지 질환, 즉 아스피린과 같은 약물 또는 음식에 의한 천식이나 알러지성 기관지 천식 등을 포함하는 천식, 담마진, 아나필락시, 알러지성 비염, 알러지성 기관지 확장증, 건초열, 아토피성 피부염과, 말라리아의 예방 및 치료를 위한 약제학적 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

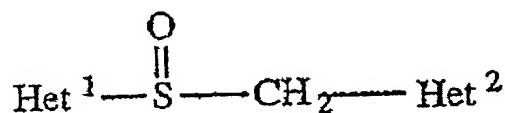
【특허청구범위】

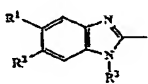
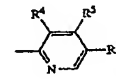
【청구항 1】

양성자 펌프 저해 활성을 지니는 벤즈이미다졸계 화합물을 유효성분으로 함유하는 IgE-의존적 히스타민 방출 인자(HRF)의 분비 억제용 조성물

【청구항 2】

제 1항에 있어서, 벤즈이미다졸계 화합물은 치환된 벤즈이미다졸 링, 피리딘 고리 및 그 사이에 위치하는 메칠설파닐기로 이루어진 지질 용해성 약염기로, 하기 화학식의 구조를 지님
을 특징으로 하는 HRF 분비 억제용 조성물



상기 식에서 Het¹은  이고, Het²는  이며, R¹ 및 R²는 동일하거나 상

이하고, 수소, 메톡시 및 디플루오로메톡시로부터 선택되고, R³은 수소와 나트륨으로부터 선택되고, R⁴, R⁵ 및 R⁶는 동일하거나 상이하고, 수소, 메틸, 메톡시, 메톡시프로폭시 및 트리플루오로에톡시로부터 선택됨

【청구항 3】

제 2항에 있어서, 벤즈이미다졸계 화합물은 오메프라졸, 란소프라졸, 판토프라졸, 라베프라졸, 이들의 유도체 및 이성질체 중에서 선택된 하나 이상임을 특징으로 하는 HRF 분비 억제용 조성물

【청구항 4】

제 3항에 있어서, 양성자 펌프 저해 활성을 지니는 페녹티민, 올레인산, 카테킨, 스코파둘시올, 펜타갈로일 글루코스, 부파린, 그리고 마크로라이드계 항생제인 바필로마이신 및 콘카나마이신 중 선택된 하나 이상의 물질을 추가로 함유하는 HRF 분비 억제용 조성물

【청구항 5】

제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항에 있어서, HRF에 의해 유발되는 각종 알러지 질환, 즉 천식, 담마진, 아나필락시스, 알러지성 비염, 알러지성 기관지 확장증, 건초열, 아토피성 피부염과, 말라리아의 예방 및 치료용 조성물

【청구항 6】

제 5항에 있어서, 천식, 담마진, 알러지성 기관지 확장증, 아토피성 피부염의 예방 및 치료용 조성물

【청구항 7】

제 5항에 있어서, 아나필락시스, 알러지성 비염, 건초열의 예방 및 치료용 조성물

【청구항 8】

제 5항에 있어서, 말라리아의 예방 및 치료용 조성물

【청구항 9】

양성자 펌프 저해 활성을 지니는 페녹티민, 올레인산, 카테킨, 스코파둘시올, 펜타갈로일 글루코스, 부파린, 그리고 마크로라이드계 항생제인 바필로마이신 및 콘카나마이신 중 선택된 하나 이상의 물질을 단독으로 함유하는 HRF 분비 억제용 조성물

102() 5511

출력 일자: 2003/11/14

【청구항 10】

제 9항에 있어서, HRF에 의해 유발되는 각종 알러지 질환, 즉 천식, 담마진, 아나필락시스, 알러지성 비염, 알러지성 기관지 확장증, 건초열, 아토피성 피부염, 말라리아의 예방 및

치료용 조성물

【청구항 11】

제 10항에 있어서, 천식 및 담마진 알러지성 기관지 확장증, 아토피성 피부염의 예방 및
치료용 조성물

【청구항 12】

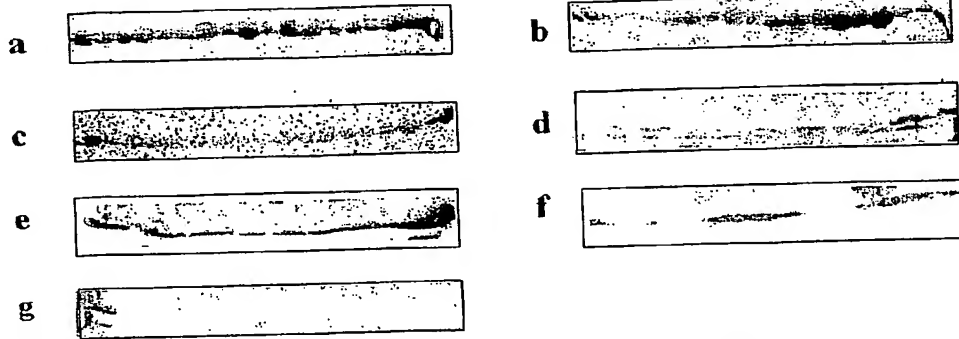
제 10항에 있어서, 아나필락시스, 알러지성 비염, 건초열의 예방 및 치료용 조성물

【청구항 13】

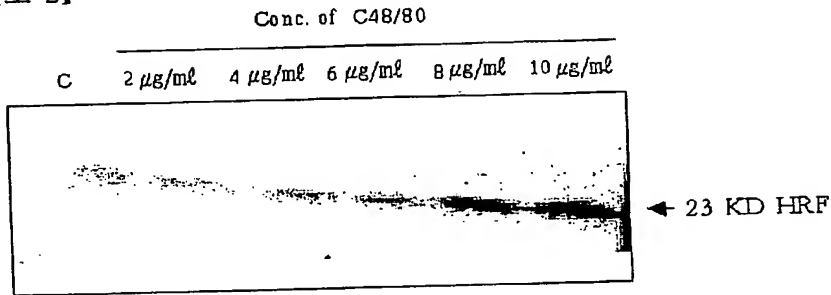
제 10항에 있어서, 말라리아의 예방 및 치료용 조성물

【도면】

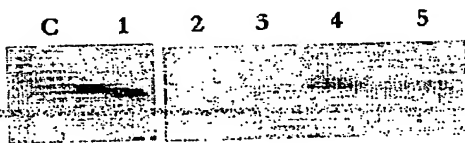
【도 1】



【도 2】



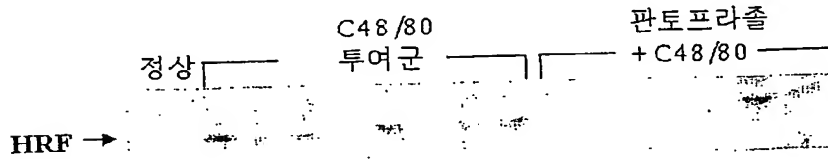
【도 3】



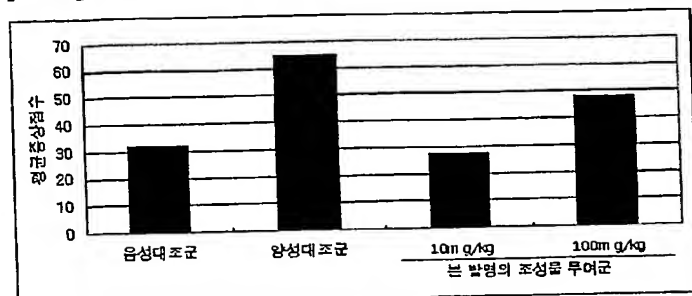
C: control

1: C48/80 10 $\mu\text{g/ml}$ 2: omeprazole 10 μM 3: omeprazole 100 μM 4: omeprazole 10 μM + C48/80 10 $\mu\text{g/ml}$ 5: omeprazole 100 μM + C48/80 10 $\mu\text{g/ml}$

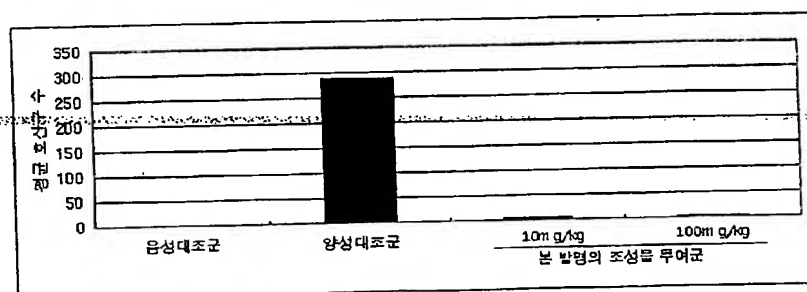
【도 4】



【도 5】



【도 6】



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.